

THESIS

TÜBINGEN

1967^{rw}

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Bestimmung der arterio-venösen Differenzen
der Zitronensäure in der menschlichen Niere

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karl Theo/Eysel
aus Eschwege

1967

8987

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153519_0017

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Bestimmung der arterio-venösen Differenzen
der Zitronensäure in der menschlichen Niere

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Karl Theo Eysel

aus Eschwege

1967

Dekan: Professor Dr. W. Schneider

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Nieth
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. E. Bock

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	 1
2. Die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel	 3
3. Die Stellung der Zitronensäure im Organismus	 5
4. Methodik	 6
a) Versuchsbedingungen	 6
b) Methode und Besprechung der Arbeits- anleitung zur Bestimmung der Zitronensäure im menschlichen Serum und Urin	 7
5. Krankengut	 18
6. Ergebnisse	 29
7. Diskussion der Ergebnisse	 30
8. Zusammenfassung	 33
9. Literatur	 36

1. Einleitung und Problemstellung

=====

Für die Aufrechterhaltung der Isotonie, Isoionie Isohydrie des Blutes und damit der Konstanterhaltung des inneren Milieus, kommt der Niere eine zentrale Bedeutung im Organismus zu. Diese Aufgaben löst sie:

- a) durch Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten
- b) durch die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes und
- c) durch Regulation der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Niere ist aber nicht nur Ausscheidungs-, sondern auch Stoffwechselorgan. Es finden sich in ihr eine Vielzahl von Enzymsystemen, die nahelegen, daß die Niere auch im Intermediärstoffwechsel eine große Bedeutung hat. Amino-Oxydase und Aminosäureoxydasen sind in ihr in größerer Konzentration enthalten (13). Daneben sind - wie in allen Zellen - die Enzyme des oxydativen Stoffwechsels (Citratzyklus, Atmungskette) vorhanden (13), weiterhin Fermente des Fett-, Eiweiß- und Kohlehydratstoffwechsels (22). Auch zur Synthese von Cholesterin (21), Phospholipiden (4) und Glykogen (2,14) ist die Niere in der Lage.

Stoffwechsel, Absorptions- und Sekretionsvorgänge bei der Urinbildung, Stofftransport gegen ein Konzentrationsgefälle, wie dies in den Tubuli meist geschieht, benötigen sehr viel Energie. Daher überrascht es nicht, daß die Nieren einen sehr intensiven Stoffwechsel besitzen. Bei nur etwa 0,4% am Körpergesamtgewicht beträgt der Energieumsatz etwa 6% des gesamten Ruheumsatzes. Das heißt, bezogen auf die Gewichtseinheit besitzt die Niere den höchsten Energiebedarf. Dafür wird dauernde Bereitstellung chemischer Energie benötigt.

Wir stellten uns daher die Frage, welche Substrate von der menschlichen Niere als Energielieferanten aufgenommen und verarbeitet werden.

Verschiedene Methoden ermöglichen einen Einblick in den Gewebsstoffwechsel

- a) die Untersuchung von Gewebsschnitten
- b) die Messung der arterio-venösen Differenz verschiedener Metabolite im Tierversuch oder
- c) am Menschen
- d) die radioaktive Markierung bestimmter Substanzen und die Beobachtung ihres Schicksals im Organismus.

Wir versuchten eine Antwort auf dieses Problem durch Messung der arterio-venösen Differenzen (avD) verschiedener Metabolite im Nierenblut zu finden. Neben Zitronensäure wurde die avD von Aceto-acetat, Pyruvat, Lactat, Glukose und der freien Fettsäuren bestimmt. Wie Nieth und Mitarbeiter (15) feststellten, wird freie Fettsäure im statistisch gesicherten Maß durch die menschliche Niere extrahiert und ein erheblicher Teil des Energiebedarfes aus deren Verbrennung gewonnen. Diese Ergebnisse stimmen mit der Arbeit anderer Autoren an in vivo Versuchen an der Hundeniere überein (9).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der avD der Zitronensäure in der Niere und ihrer Ausscheidung durch den Urin.

Gordon (6) konnte mit Hilfe radioaktiver Zitronensäure eine Aufnahme an der Rattenniere nachweisen. Daß Zitronensäure auch in den Harn ausgeschieden wird, wurde 1916 erstmals von Salant und Wiese beschrieben (20).

Bevor wir nun auf die eigentliche Problemstellung eingehen, ob Zitronensäure durch die menschliche Niere extrahiert wird, soll noch kurz die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel und im Organismus skizziert werden.

2. Die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel

=====

Proteine, Kohlenhydrate und Fette finden ihren Endabbau im Zitronensäurezyklus, aber auch zum Aufbau vieler körpereigener Stoffe stellt der Zitronensäurezyklus (Krebs) die erforderlichen Bausteine zur Verfügung. Über die Oxalessigsäure steht er in Beziehung zum Glukoseaufbau, Asparagin- und Glutaminsäure erhalten das Rohmaterial für ihre Synthese aus dem Krebszyklus.

Für den Abbau der Stoffwechselprodukte im Citratcyklus ist stets der an das Coenzym A gebundene Essigsäurerest das Ausgangsmaterial. Als Starter für den Reaktionsablauf dient die Oxalessigsäure, die wieder als letztes Produkt aus dem Zyklus hervorgeht und zusammen mit der aktivierten Essigsäure die Zitronensäure bildet. Der Zitronensäurezyklus selbst läuft nur in Verbindung mit der Atmungskette ab, was für die Energiebilanz des Körpers von entscheidender Bedeutung ist. Die aus dem Abbau der Stoffwechselprodukte gewonnene Energie wird als Wärme zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und als chemische Energie in Form des Adenosintriphosphates ATP abgefangen. Zwar wird im Citratcyklus nur 1 ATP gewonnen, dafür wird hier die Hauptmenge des Kohlendioxyds produziert. In Verbindung mit der Atmungskette werden daher aus dem Citratcyklus 12 ATP gewonnen:

aus Stufe 4, 6 und 10 (s.Abb.1) durch DPNH-Oxydation je drei = 9 ATP

aus Stufe 8 durch Flavin-Oxydation 2 ATP

aus Stufe 7 durch Übertragung der energiereichen Bindung 1 ATP (nach Karlson (12))

Grundsätzlich können zwar alle DPNH-abhängigen Dehydrierungen mit der Atmungskette gekoppelt werden, aber die enge räumliche Beziehung zwischen Citratcyklus und Atmungskette in den Mitochondrien und die reichliche Bindung reduzierten Coenzyms im Citratcyklus stellen zwischen beiden eine besonders enge Verbindung dar.

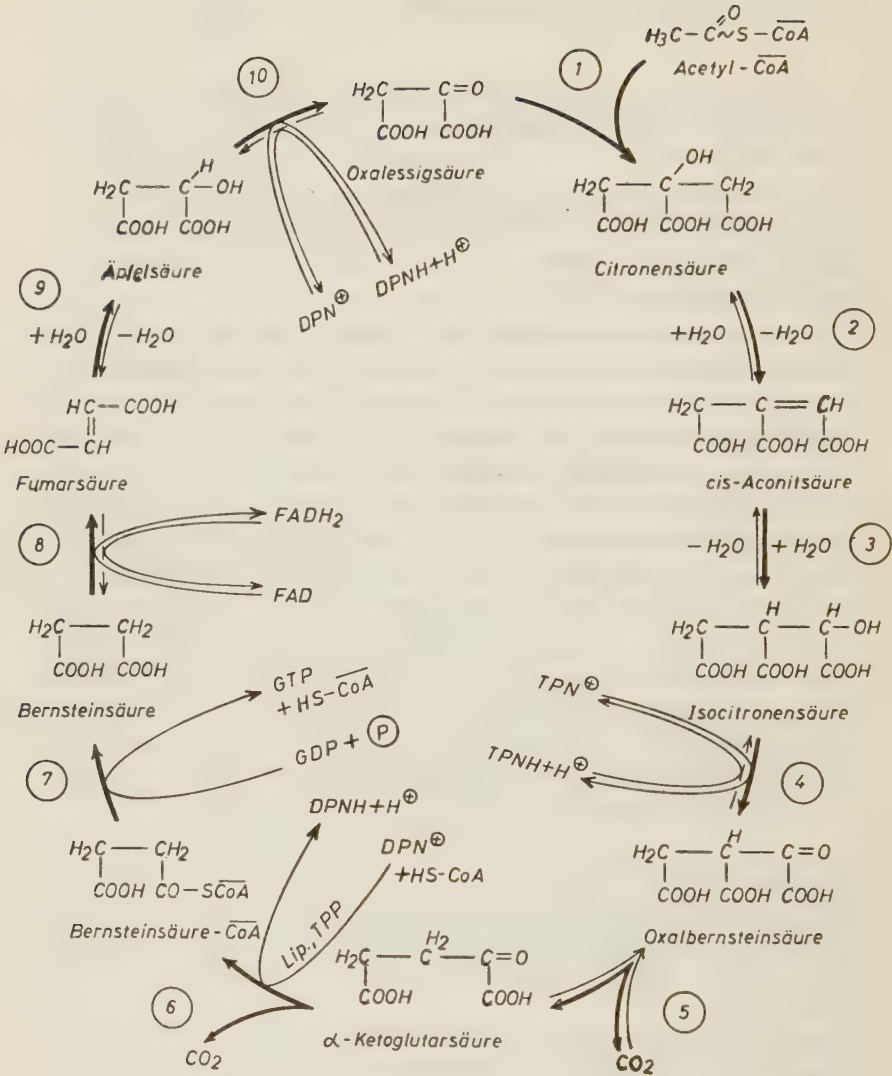


Abb. 1 die Zitronensäure im Krebszyklus (nach Karlson (11))

3. Stellung der Zitronensäure im Organismus

=====

Aus der zentralen Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel geschehen geht hervor, daß der tägliche Bedarf recht erheblich sein muß. Die dem Körper mit der Nahrung zugeführte Zitronensäure (Ci) von 2-10g/die hat daran den geringsten Anteil. Die Hauptmenge der benötigten Ci wird vom Organismus selbst gebildet. So wird die im intermediären Stoffwechsel gebildete Ci auf 100-500g/die geschätzt (18,10), bei überwiegend kohlenhydratreicher Ernährung können sogar bis zu 2000g/die gebildet werden.

Das zeigt, daß die endogen gebildete Zitronensäure die bei normaler Kost zugeführte Ci um das 200-fache übersteigen kann. Davon finden sich im Urin nur 500-1000mg/die beim nierengesunden Menschen wieder. Die Hauptmenge der zugeführten und gebildeten Ci verfällt demnach dem oxydativen Abbau im Organismus, was vorwiegend in der Leber und in der Niere vonstatten gehen soll. Nach in vitro Versuchen von Luca und Mitarb. (3) besitzt Nierengewebehomogenat die höchste Oxydationsrate für Zitronensäure vor Leber, Gehirn, Herz und Milz.

Transportmedium der Ci im Organismus ist das Plasma. Gordon (6) konnte in Versuchen mit radioaktiver C^{14} -Zitronensäure nachweisen, daß die gebundene Ci hauptsächlich in Proteine und Lipide eingelagert ist.

Daneben ergaben die Versuche, daß die im Blut befindliche Ci sehr schnell umgesetzt wird. 3 Stunden nach i.v. Injektion radioaktiver Ci konnten 90% der C^{14} -markierten Kohlenstoffatome in der Ausatemungsluft und im Urin nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß nach 3 Stunden annähernd 1% der radioaktiven C-Atome in den Protein- und Lipidanteilen der Niere und Leber eingelagert wurde. Dabei nimmt die Einlagerung in Protein einen weitaus größeren Umfang als in Lipid ein. Pro Gramm Gewebe zeigte die Niere dabei eine mehrfach höhere Radioaktivität als die Leber.

Ein weiterer Anteil der injizierten radioaktiven Ci wird wahrscheinlich vom Knochen aufgenommen und später wieder freigelassen oder im Stoffwechsel aufgebraucht.

Rechenberger und Bensdorf (18) konnten zeigen, daß in verschiedenen Lebensphasen der Zitronensäurespiegel des Blutes von unterschiedlicher Höhe ist und mit zunehmendem Alter absinkt, woraus sie eine Verminderung und ein Trägerwerden bestimmter intermediärer Stoffwechselumsätze vermuten. Auch bei krankhaften Störungen von Stoffwechselvorgängen, z.B. beim Diabetes mellitus oder der Fettsucht ist der Ci-gehalt des Blutes vermindert. Diese beiden Beispiele sollen nur kurz die Bedeutung der Zitronensäure im gesamten Stoffwechsel andeuten.

4. Methodik

=====

a) Versuchsbedingungen

Wie schon erwähnt, versuchten wir einen Einblick über das Schicksal der Zitronensäure in der Niere zu gewinnen durch Bestimmung der avD, das heißt der Aufnahme und Abgabe durch das Blut und Messung der Ci-Ausscheidung im Urin. Dabei wurde methodisch folgendermaßen vorgegangen:

Die Versuchspersonen erhielten am Vorabend des Versuchstages ihre letzte Mahlzeit. Am nächsten Morgen bekamen sie nüchtern 600ml Tee, um eine konstante Basisdiurese zu erhalten. Nach Legen eines Blasenverweilkatheters und Gabe von 0,22 Luminal i.m. erfolgte in Lokalanästhesie die Punktion der Vena femoralis nach der Methode von Seldinger.

Unter Röntgenkontrolle wurde nun ein Teflonkatheter Nr. 8 in die Vena renalis vorgeschoben. Als Kriterien für die exakte Lage des Katheters galten neben der anatomischen Position:

1. Die im Röntgenbild sichtbare Atemverschieblichkeit der nach rechts abgewichenen Katheterspitze.
2. Die relativ geringe arterio-venöse Sauerstoffdifferenz von im Mittel 1,6 Vol%, welche makroskopisch schon an der helleren Färbung des Nierenvenenblutes auffiel.
3. Das Ergebnis der bei jedem Versuch mitbestimmten Extraktion von PAH.

Das arterielle Blut entnahmen wir aus der Arteria brachialis. Arteriell und venös Blut wurden gleichzeitig mit einer 20 ccm Spritze innerhalb von 20 sec abgenommen und in ein Reagenzglas gegeben, in welches wir zuvor 2-3 Tropfen Lique-min zur Ungerinnbarmachung des Blutes zugeben. Etwa zur gleichen Zeit wurde auch der benötigte Katheterurin abgenommen.

Die Bestimmung der Zitronensäure im Urin und Blut erfolgte nach der Pentabromazetonmethode in der Modifikation nach Gey (5), die im folgenden Abschnitt ausführlich besprochen werden soll.

b) Methode und Besprechung der Arbeitsanleitung zur Bestimmung von Zitronensäure im menschlichen Serum und Urin

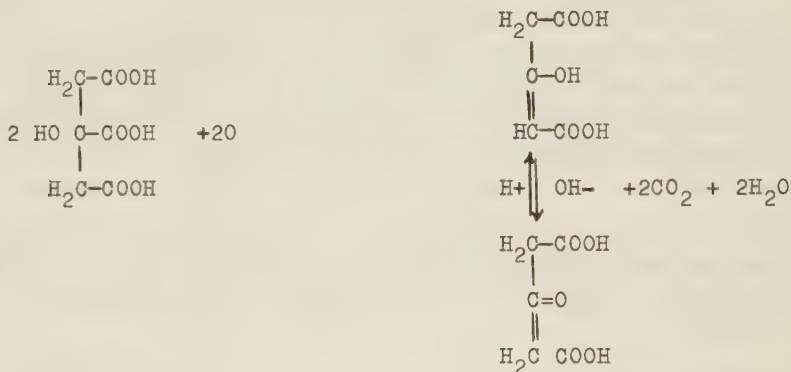
Zur quantitativen Bestimmung der Zitronensäure in Zellen und Geweben haben wir heute eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Zur Bestimmung der Zitronensäure im Plasma bevorzugt man in der Klinik allgemein jene Methoden, bei denen Zitronensäure in Pentabromazeton überführt wird. Das Pentabromazeton (Pba) ergibt auf verschiedene Weise eine oolometrierbare Farbe. Für unsere Versuche entschlossen wir uns für die von K.F.Gey (5) empfohlene Arbeitsvorschrift, die nur geringfügig verändert wurde. Gegenüber anderen auf der Pba-Bildung beruhenden Methoden ist diese in der Versuchsanordnung relativ einfach und von hoher Genauigkeit. Bei unseren Versuchen lag die Fehlerbreite unter 4%.

Alle quantitativen Bestimmungen der Zitronensäure (Ci), die auf der Pba-Bildung beruhen, haben zwei Arbeitsgänge gemeinsam. Der erste Schritt besteht in der Bildung des Pba. Nach

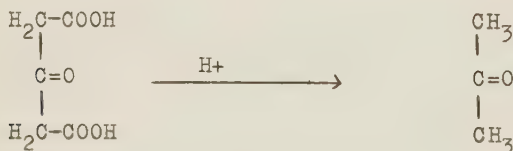
Wiig und Pedersen (23) hat man sich dies folgendermaßen vorzustellen:

Reaktionsschema der Pba-Bildung

1. Zitronensäure wird im sauren Milieu (konz. H_2SO_4) durch Zugabe eines Oxydationsmittels (KMnO_4) zu Azetondikarbonsäure oxydiert.

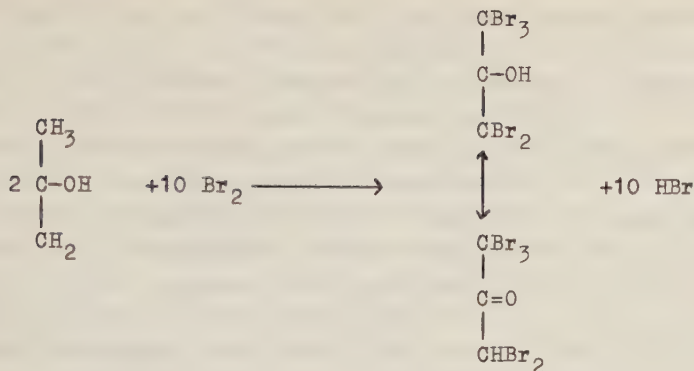


2. Die Azetondikarbonsäure wird oxydativ zu Azeton decarboxyliert.



Spontane (oder oxydative) Decarboxylierung der Azetondikarbonsäure ausschließlich in Ketoform (Reaktion 1. Ordnung)

3. In Gegenwart von Brom wird das Azeton sofort zu Pba bromiert.



Bromierung des Azetons in Enolform, die sofort nach der Decarboxylierung der Azetondikarbonsäure entsteht (Reaktion 2. Ordnung)

Im 2. Schritt wird das im Extraktionsmittel (Petroläther, Hexan, Heptan) gelöste Pba auf verschiedenem Weg gefärbt und mit dem Photometer kolorimetrisch bestimmt.

Zur Färbung benutzten wir eine Thioharnstoff-Borax-Lösung, welche mit Pba einen Komplex bildet, der in wässriger neutraler oder alkalischer Lösung gelb ist. Zur Photometrie wurde das Eppendorf-Photometer benutzt.

Nach anderen Verfahren wird z.B. Pba durch Natriumsulfid dehalogenisiert und das Brom photometriert, oder Brom wird durch Jodid stufenweise ersetzt, das Jod wieder abgespalten und als molekulares Jod photometrisch nachgewiesen.

Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von Zitronensäure

Diese Arbeitsanleitung gilt für Mengen im Bereich von 10 bis 200γ Zitronensäure..

Reagentien:

10%ige Trichloressigsäure (CCl_3COOH): 100 g Trichloressigsäure p.a. werden in 900ccm dest.Wasser gelöst.

Konzentrierte Schwefelsäure p.a., 95-97%ig.

Gesättigtes Bromwasser: 5g Brom in 100ccm dest.Wasser gut mischen.

1n Kaliumbromid-Lösung (KBr): 11,9g KBr p.a. in 100ccm dest. Wasser lösen.

Metaphosphorsäure 20%ig: 20g Metaphosphorsäure p.a. in 100ccm dest. Wasser lösen.

1,5n Kaliumpermanganat (KMnO_4): 4,74g KMnO_4 in dest. Wasser lösen, auf 100ccm auffüllen.

3%iges Wasserstoffperoxyd: 30%ige H_2O_2 -Lösung mit dem 9fachen Vol. dest. Wasser verdünnen.

Hexan (Sdp. 68-69°C): Das Hexan muß gereinigt werden, falls nicht sehr gut destilliertes Hexan zu erhalten ist. Z.B. Merck: Hexan für Spektroskopie.

Phosphat Puffer, pH 7,0 (nach Sörensen): 11,8g sek. Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$) werden in 1000ccm dest. Wasser gelöst, desgleichen 9,09g prim. Kaliumphosphat (KH_2PO_4) in 1000ccm dest. Wasser.

78ccm der Kaliumphosphat-Lösung werden mit 122,0ccm der Natriumphosphat-Lösung gemischt und 600ccm dest. Wasser zugegeben.

Thioharnstoff-Borax-Lösung: 4g krist. Natriumtetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 10\text{H}_2\text{O}$) und 4g Thioharnstoff ($\text{H}_2\text{N-CS-NH}_2$) sind in 100ccm dest. Wasser zu lösen.

Als Extraktionsmittel wird bei den meisten Autoren Petroläther mit einem Sdp. von 80-100°C verwendet. Man kann aber auch tiefer siedende Mittel benutzen (5). Wir benutzten Hexan Sdp. 68-69°C.

Reinigen des Petroläthers. (3)

700ccm Petroläther werden mit 100ccm konz. Schwefelsäure geschüttelt. Über Nacht absetzen lassen. Am folgenden Tag wird der Petroläther noch 3mal mit je 50cm³ konz. Schwefelsäure im Schütteltrichter gewaschen und mehrfach mit Aqua dest. nachgewaschen, schließlich mit ges. Kaliumpermanganat-Lösung in 5%iger Schwefelsäure mehrere Minuten kräftig geschüttelt und 30 Min. stehen gelassen. Mit Aqua dest. erneut nachwaschen,

Bis Waschwasser und Petroläther jede Färbung verloren haben. Eine Probe darf mit konz. Schwefelsäure keinerlei Färbung mehr geben, sonst muß die gesamte Prozedur wiederholt werden. Schließlich wird in einem üblichen Destillationsapparat mit Thermometer destilliert, der zwischen 80-100° (bzw. tiefer liegend, je nach verwendetem Extraktionsmittel) siedende Anteil wird verwendet. Das Destillationsprodukt ist zunächst schwach opalisierend und wird nach 1/2-1 Std. wasserklar.

Ausführung:

Ungefähr 10ccm Vollblut werden sofort nach der Blutentnahme in ein mit 3 Tropfen 4%iger Heparinlösung versetztes Zentrifugenglas gegeben, auf Zimmertemperatur abgekühlt und /10 Min bei 2500-3000 U/Min zentrifugiert. Zu 4ccm des überstehenden Plasmas werden in einem Erlenmeyerkolben von 50ccm unter Schütteln 20ccm 10%iger Trichloroessigsäure zugegeben. Nach 10 Minuten filtriert man durch ein hartes Filterpapier, gibt 20ccm des enteiweißten Filtrats in einen Rundkolben von etwa 100ccm und fügt 2,5ccm konz. Schwefelsäure dazu. Das Filterpapier muß vorsichtig ausgedrückt werden, um genügend Filtrat zu gewinnen. (Falls notwendig, kann die Lösung in diesem Zustand einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen bleiben.) Das angesäuerte enteiweißte Filtrat wird 10 Min in ein kochendes Wasserbad gebracht, anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit 1ccm gesättigtem Bromwasser versetzt. Falls die gelbe Bromfarbe innerhalb 5 Min verschwindet, muß weiter Brom zugesetzt werden, bis sie erhalten bleibt. Nach 5 Min werden 1ccm 1n Kaliumbromid-Lösung, 2ccm 20%ige Metaphosphorsäure und unter Schütteln des Kolbens 2-3ccm 1,5n Kaliumpermanganat-Lösung zupipettiert. Der am violetten Farbton erkennbare Kaliumpermanganat-Überschuß muß während der folgenden 30 Min bestehen bleiben (eventuell durch weiteren Zusatz). Nach 30 Min Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird der Kolben in Eiswasser gestellt. Erst wenn der Inhalt des Kolbens auf 1-2°C abgekühlt ist, wird der Überschuß an Brom und Kaliumpermanganat durch Zugabe ebenfalls tiefgekühlter 3%iger Wasserstoffperoxydlösung entfernt. Dies muß mit besonderer Sorgfalt portionenweise in Abständen von mindestens 30 Sekunden und unter

steter Kühlung im Eiswasser erfolgen, da ein Überschuß an Wasserstoffperoxyd erhebliche Mengen an Pentabromazeton zerstören kann! Die Entfernung erfordert beim Vorhandensein von viel Brom etwa eine halbe Stunde. Die vollständig farblose Lösung wird dann in einen Scheidetrichter von etwa 100ccm gebracht, der Kolben 2mal mit wenig Wasser und anschließend mit 15ccm kaltem Hexan ausgespült. Mit diesem Hexan wird danach die wässrige Phase etwa 5 Min kräftig geschüttelt. Nach vollständiger Trennung wird die wässrige Phase abgelassen und die Hexanphase mit etwa 10ccm Wasser und anschließend mit 10ccm Phosphatpuffer (pH 7) durch kräftiges Schütteln etwa 1/2-1 Min ausgewaschen. Der Stopfen des Scheidetrichters soll dabei jeweils mit einigen Tropfen Hexan abgespült werden. Nachdem die Abtrennung der letzten wässrigen Phase besonders sauber erfolgt ist, werden 10ccm 4%ige Thioharnstoff- und 4%ige Borax-Lösung in den Scheidetrichter gegeben und das Hexan während 5-7 Min kräftig geschüttelt. Der größte Teil der nun gelb gefärbten unteren wässrigen Phase ist mit einer Pipette in ein Zentrifugenglas zu überführen. Nach 5minütigem Zentrifugieren bei 2500 U/Min kann gegen einen entsprechenden Leerwert aus einer 4%igen Thioharnstoff- und 4%igen Borax-Lösung bei 436 mμ kolorimetriert werden. Zur Photometrie benutzten wir Küvetten von 2ccm Schichtdicke. Für die Auswertung nahmen wir jeweils die 20 Min nach dem letzten Zentrifugieren von der Photometerskala abgelesenen Werte. Bei jedem Versuch sollte ein Standardwert von 50 oder 100y Ci gemessen werden, um mögliche Fehler zu erfassen (zu alte Lösungen, ungenügender KMnO_4 -Überschuß, mangelnde Kühlung etc.).

Urin:

Man verdünnt den Urin mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10 und versetzt 4ccm des verdünnten Urins mit 3ccm konz. Schwefelsäure, kocht 10 Min im Wasserbad und setzt nach Abkühlung der Lösung auf Zimmertemperatur 1ccm Bromwasser dazu. Der Bromüberschuß muß bestehen bleiben. Anschließend Zusatz von 1ccm Kaliumbromid und 2ccm 20%iger Metaphosphor-

säure sowie 3ccm Kaliumpermanganat-Lösung (eventuell mehr, bis violetter Farbton bestehen bleibt.). Alles weitere wie beim Blut. Eiweißhaltiger Urin wird mit 10%iger Trichlor-essigsäure und destiliertem Wasser versetzt, so daß die Verdünnung 1 : 10 gewahrt bleibt. Vom Filtrat werden wiederum 4ccm verwendet.

Standard-Kurve (Abb.2):

100mg wasserfreie Ci oder 109,8mg Ci mit ein Mol Kristallwasser werden auf einer Analysenwaage eingewogen, in 100ccm 0,1n Schwefelsäure gelöst und 10ccm dieser Lösung mit 0,1n Schwefelsäure auf 1000ccm aufgefüllt. 1ccm dieser Lösung enthält 10γ Ci. Je 2, 4, 6,... bis zu 20ccm dieser Lösung werden mit Wasser auf ein Volumen von 20ccm aufgefüllt, dann 2,4ccm konz.Schwefelsäure zugesetzt und entsprechend den Angaben über enteweißtes Blutfiltrat weiterverarbeitet. Bei der Standard-Kurve ist das 10-minütige Kochen nicht notwendig. Die Standard-Kurve verläuft nicht ganz linear, daher sollten die Fixpunkte nicht mehr als 20γ auseinanderliegen. -

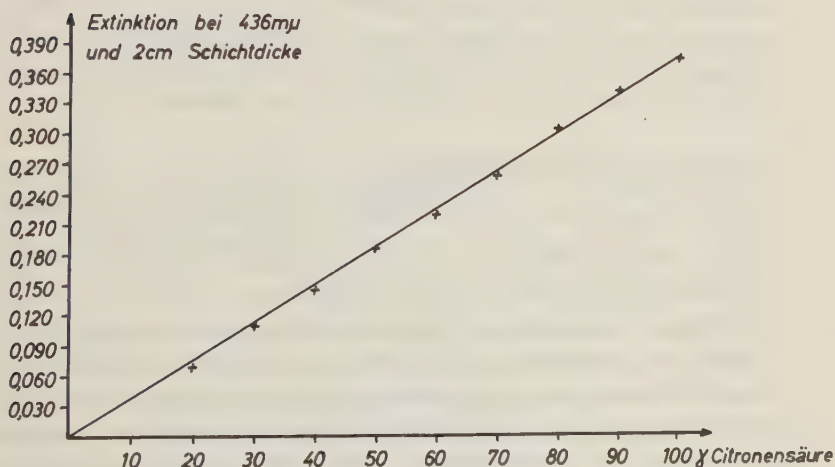


Abb. 2: Eichkurve

Die Ci-Lösungen sind in 0,1n Schwefelsäure mindestens 2 Jahre beständig.

Berechnung der Ci-Menge:

Der Vergleich der gemessenen Extinktionen mit den Werten der Standardkurve setzt voraus, daß stets 15ccm Hexan mit je 10ccm Thioharnstoff-Borax-Lösung während mindestens 5 Minuten einheitlich extrahiert werden. Die auf der Standardkurve abgelesenen Ci-Werte werden folgendermaßen auf 100ccm umgerechnet:

a) Plasma:

Da von 4ccm Blutplasma 20/24 verarbeitet werden, finden sich in 100ccm:

$$x. \frac{24 \cdot 100}{20 \cdot 4} = 30$$

Der auf der Eichkurve gefundene Wert muß also mit 30 multipliziert werden, wenn man die Ci-Menge in mg% erhalten will.

b) Urin:

Bei der Verarbeitung von Urin gibt der gemessene Wert die Ci-Menge von 0,4ccm Urin an. Man braucht den auf der Eichkurve gefundenen Wert also nur mit 2,5 zu multiplizieren, wenn man die in 1ccm enthaltene Ci-Menge errechnen will. Die Ci-Menge des Tagesurins ergibt sich durch Multiplikation mit der Anzahl der Kubikzentimeter der Tagesurinmenge.

Besprechung der Arbeitsanleitung

Bei der Herstellung der Eichkurve mit einer Standardlösung stießen wir am Anfang auf einige Schwierigkeiten, auf die hier kurz eingegangen werden soll.

Gey fordert in seiner Arbeitsanleitung, daß bei der Pba-Bildung ein dauernder KMnO_4 -Überschuß vorhanden sein soll. Dies ist nach unseren Erfahrungen auch richtig, doch sollte die Kaliumpermanganatmenge nicht zu hoch sein, da man zur Entfernung des Überschusses zuviel Wasserstoffperoxyd benötigt, wobei wir trotz sorgfältiger und langsamer Zugabe des

Wasserstoffperoxyds Pba-Verluste bis zu 15% feststellten. Außerdem benötigt man nahezu eine Stunde bis zum Entfärben der Lösung. Wir fanden statt der geforderten 4ccm KMnO_4 für Plasma und 8ccm für Urin 2ccm für Plasma und 3ccm für Urin als ausreichend, um einen dauernden Kaliumpermanganat-Überschuß herzustellen. Bei diesen Mengen benötigt man zum Entfernen des überschüssigen Permanganats 10-15 Min. Ein weiteres, störendes Kriterium war die Bildung von Braunstein. Braunstein, MnO_2 , entsteht bei der Reduktion von Permanganat. Auf die Pba-Bildung hat es weder einen negativen noch positiven Einfluß. Störend wirkt es nur bei der späteren Entfernung durch H_2O_2 , da sich der Umschlag von schwach violett zu farblos nicht so schön verfolgen läßt, so daß man leicht zuviel H_2O_2 dazugibt, wodurch sofort Pba zerstört wird. Nach einem Vorschlag von Hargreaves, Abrahams und Vickery (8) konnten wir die Braunsteinbildung durch Zugabe von 2ml einer 20%igen Metaphosphorsäure verhindern. Metaphosphorsäure hat keinen sonstigen Einfluß auf die Reaktion und verändert auch nicht die Extinktion.

Ci-Menge	Ohne M.	Mit M.
50γ	$E_1=0,188$	$E_1=0,188$
50γ	$E_2=0,184$	$E_2=0,190$
100γ	$E_1=0,375$	$E_1=0,375$
100γ	$E_2=0,370$	$E_2=0,375$

Vergleich je zweier Werte von 50 und 100 Ci mit und ohne Metaphosphorsäure (M). E = Extinktion

Der Farbumschwung läßt sich aber jetzt sehr gut verfolgen und Pba-Verluste durch H_2O_2 Überschuß vermeiden. Durch diese beiden Maßnahmen, weniger KMnO_4 und Zugabe von Metaphosphorsäure, konnten wir erreichen, daß die Differenzen der Doppelbestimmungen unter 4% lagen, wobei auch noch zu berücksichtigen ist, daß das Photometer schon eine Fehlerbreite von $\pm 2\%$ aufweist.

Nach der Entfernung des überschüssigen Broms und Kaliumpermanganats soll man nach Gey (5) in einem Scheidetrichter die wässrige Phase mit dem Extraktionsmittel (Petroläther, Hexan) während einer Minute kräftig schütteln. Diese Zeit ist nach unseren Erfahrungen unzureichend, da eine Minute nicht genügt, um das Pba quantitativ in das Extraktionsmittel zu bringen. Besonders auffällig ist dies in den kleineren γ -Bereichen. Bei 10 und 20 γ gelangten nur etwa 50% Ci in das Hexan, bei 30 und 40 γ nur etwa 70-90%. In höheren γ -Bereichen machte sich der Verlust nicht mehr bemerkbar. Schüttelt man dagegen die beiden Phasen etwa 5 Minuten kräftig aus, kann man das Pba auch bei diesen kleinen Mengen nahezu vollständig in das Hexan bringen.

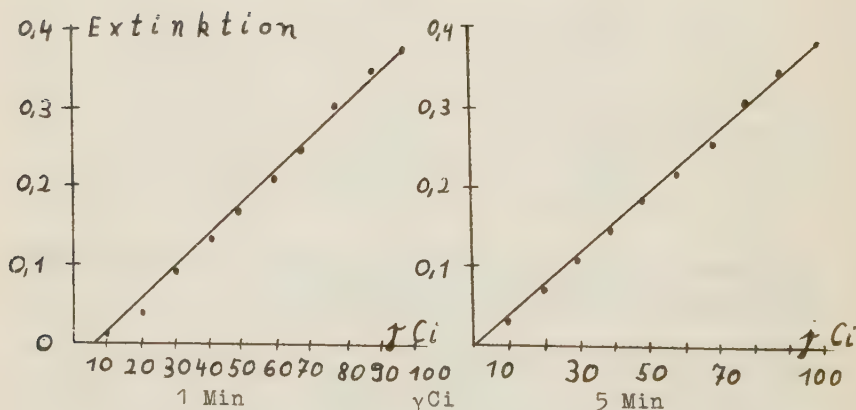


Abb. 3: Standardkurven aus reinen Ci-Lösungen nach ein- und fünfminütigem Ausschütteln

Der Vergleich beider Kurven zeigt deutlich, daß erst bei Ci-Mengen von 30γ Pba quantitativ in das Extraktionsmittel gelangt. Bei fünfminütigen Ausschütteln läuft die Kurve durch den O-Punkt, bei einminütigem Ausschütteln ist erst bei etwa 10γ eine Extinktion meßbar.

Für das anschließende Auswaschen mit dest. Wasser und Puffer genügen 30-45 sek.

Bei Versuchen mit Ci-Standardlösungen stellten wir fest, daß durchschnittlich 20-30 Min. nach dem letzten Zentrifugieren sich die Extinktion nicht mehr erhöhte, die Reaktion also abgeschlossen ist. Nach ungefähr 40 Min. verminderte sich die Extinktion, d.h. daß der Pba-Thioharnstoff-Borax-Komplex wieder zerfällt. 20-40 Min. nach dem letzten Zentrifugieren blieb die Extinktion konstant. Bei der Verarbeitung von biologischem Material (Plasma, Urin) stellten wir dagegen große Unterschiede für die günstigste Zeit zur Messung der Extinktion fest. Zum Teil war die Reaktion schon etwa 30 Min. nach der Komplexbildung abgeschlossen und die Extinktion ging wieder zurück. In der Mehrzahl der Fälle wurde noch 60 Min. nach der Komplexbildung eine Erhöhung der Extinktion festgestellt und erst nach ungefähr 1 1/2 Std. begann der Komplex zu zerfallen. Um einheitliche, vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden zur Auswertung alle 20 Min. nach dem letzten Zentrifugieren gemessenen Werte verwendet, d.h. 30 Min. nach dem Beginn der Komplexbildung.

Die Menge der Zitronensäure im Urin ist großen Schwankungen unterworfen. Unser kleinster Wert betrug 30γ/ml, der größte 833γ/ml. Der Durchschnitt der Werte lag zwischen 80 und 200γ/ml. Wie wir oben schon erwähnten, spricht die angewandte Methode bei Ci-Mengen unter 30γ nicht so sauber an, wir empfehlen daher in unserer Arbeitsanleitung 4ccm des 1 : 10 verdünnten Urins zu verarbeiten, um in den günstigsten Meßbereich zu kommen. Bei extrem hohen Ci-Gehalt des Urins sollte der Versuch aber mit kleineren Portionen, 1 bzw. 2ccm des 1 : 10 verdünnten Urins, wiederholt werden. Zu hohe Extinktionen lassen sich erstens nicht mehr so genau ablesen, zweitens können wir nicht garantieren, daß bei Ci-Mengen

über 400γ die Zitronensäure quantitativ in Pba umgesetzt wird.

Die Verwendung von Wasserstoffperoxyd zur Entfernung des überschüssigen Broms und Permanganats hat sich gegenüber anderen Mitteln als das Günstigste erwiesen. Man muß jedoch sehr vorsichtig arbeiten, da ein geringer Überschuß von H_2O_2 schon erhebliche Mengen Pba zerstört. Die Entfernung muß bei ausreichender Kühlung erfolgen. Sowohl die H_2O_2 -Lösung als auch der Kolben sollen während dieser Prozedur stets in Eiswasser sein. Wir gaben anfangs alle 60sek. 3 Tropfen der 3%igen H_2O_2 -Lösung unter stetigem Schütteln in den Kolben, in der Nähe des Umschlagpunktes violett zu farblos alle 30 sek. ein Tropfen. Gibt man zu große Portionen Wasserstoffperoxyd auf einmal, ist mit Pba-verlusten zu rechnen.

Daß alle Versuchsgeräte stets sorgfältig gereinigt sind, versteht sich von selbst.

5. Krankengut =====

Bei insgesamt 26 Patienten wurden unsere Untersuchungen durchgeführt. Davon waren 21 Männer und 5 Frauen. In einem Fall (Nr.13) ergab die Bestimmung der PAH-Extraktion und der avD für Sauerstoff, daß wir mit dem Katheter nicht in der Nierenvene lagen. Klinisch teilte sich das Krankengut folgendermaßen auf:

5 Nierengesunde (Nr.5; 7; 9; 14; 20;), 4 Patienten mit nephrotischem Syndrom (1; 12; 15; 22;), 4 chronische Glomerulonephritiden (Nr.2; 8; 17; 21;), 3 chronische Pyelonephritiden (Nr.3; 19; 25;), 3 interstitielle Nephritiden (Nr.6; 23; 24;), wobei bei Fall 23 und 24 gleichzeitig eine Gicht bestand, 2 Fälle mit renaler Hypertonie (Nr.10; 11;), 2 essentielle Hypertonien (Nr.13; 26;), je ein Fall mit Diabetis mellitus (Nr.18), Diabetis insipidus (Nr.4) und renaler Osteodystrophie (Nr.16). Sämtliche Ergebnisse sind in

Tabelle 1 zusammengefaßt. Wie sich die einzelnen Werte dieser Ergebnisse errechnen, soll ein Beispiel (Fall Nr.19) erläutern.

1. Bestimmung des arteriellen und venösen Ci-Gehaltes im Plasma:

Je 4 ml Plasma wurden mit 20 ml Trichloressigsäure versetzt. Vom erhaltenen Filtrat wurden 18 ml weiterverarbeitet. Da von 4 ml Plasma 18/24 verarbeitet wurden, finden sich in 100 ml Plasma x mal soviel

$$x = \frac{24 \times 100}{18 \times 4} = 33,3 \quad (1)$$

Die Extinktion, die 20 Min. nach dem letzten Zentrifugieren bei 436 m μ und einer Küvette von 2cm Schichtdicke gemessen wurde, betrug:

1.) Arteriell (Mittelwert)

$$E_{\text{art}} = 0,168 = 45,0\gamma \text{ Ci (s. Eichkurve)}$$

$$E_{\text{art}} \times 33,3 = 45,0 \times 33,3 = 1,5\text{mg}\% \text{ Ci} \quad (2)$$

2.) Venös (Mittelwert)

$$E_{\text{ven}} = 0,117 = 31\gamma \text{ Ci (s. Eichkurve)}$$

$$E_{\text{ven}} \times 33,3 = 31 \times 33,3 = 1,032\text{mg}\% \text{ Ci} \quad (3)$$

3.) Bestimmung des Ci-Gehaltes im Urin:

Der Urin wurde 1 : 9 verdünnt. Je 4 ml des verdünnten Urins wurden weiterverarbeitet. Die Extinktion gemessen bei 436 m μ und einer Küvette von 2cm Schichtdicke betrug:

$$E_{\text{urin}} = 0,045 = 12\gamma \text{ Ci (s. Eichkurve)}$$

Da je 4 ml des 1 : 9 verdünnten Urins verarbeitet wurden, enthält 1 ml unverdünnten Urins $2,5 \times$ soviel Ci.

$$12\gamma \times 2,5 = 30\gamma/\text{ml Ci} \quad (4)$$

Das Harnminutenvolumen wurde mit 2,16 ml ermittelt.

Die Ci-Ausscheidung pro Minute beträgt also:

$$30\gamma \times 2,16 = 64,8\gamma = 0,0648\text{mg}/\text{Min} \quad (5)$$

Das durch die PAH-Clearance (C_{PAH}) bestimmte Plasmaminutenvolumen betrug 467 ml. Die PAH-Extraktion (E_{PAH}) wurde mit 83% ermittelt.

Der Quotient $\frac{C_{PAH}}{E_{PAH}}$ ist demnach

$$\frac{467 \times 100}{83} = 562 \text{ ml/Min Plasma} \quad (6)$$

Die avD des Ci-Gehaltes pro 100ml Plasma betrug:

$$\text{art Wert} - \text{ven Wert} = 1,500 - 1,032 = 0,468 \text{ mg\%} \quad (7)$$

Aus (6) und (7) errechnet sich die arterio-venöse Differenz der Ci pro Minute im Nierenblut.

$$5,62 \times 0,468 = 2,63 \text{ mg Ci/Min} \quad (8)$$

Aus der Differenz zwischen der avD/Min (8) und der im Urin gefundenen Menge an Ci/Min (5) errechnet sich die von der Niere aufgenommene Menge der Ci/Min.

$$2,63 \text{ mg} - 0,0648 \text{ mg} = 2,565 \text{ mg Ci/Min} \quad (9)$$

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, konnten teils aus technischen Gründen, teils aus klinischer Indikation nicht in jedem Versuch sämtliche Werte gewonnen werden.

Die statistischen Berechnungen erfolgten nach den Geigy-Tabellen, 6. Auflage.

Tabeller

Lfd. Nr.	Name Geschl. Alter	Diagnose	RR	Kreatinin mg%	Art. Wert mg%	Ven. Wert mg%	Urin y/ml	Harn Min.-volum. ml/Min	mgCi Urin/Min	C _{PAH} ml/Min	E _{PAH}	Plasma volum. ml/Min	avD. 100ml Plasma mg%	avD. Min mg	aufgeh. Ci/Min mg/Min	O ₂ avD Vol%
1	W.F. w	nephrot. Syndrom	120/65	0,8	1,46	1,20	84	2,26	0,19	670	66,5%	1007	0,26	2,618	2,428	0,30
2	E.A. m	chron.Glomerulonephritis	140/80	1,1	2,99	1,935	108	1,05	0,113	531	79,5%	667	0,995	6,38	6,236	1,45
3	R.F. m	chron.Pyelonephrit.	130/80	0,7	1,73	1,39	0,00	2,73	0,00	393	85,5%	460	0,340	1,564	1,564	1,55
4	K.L. m	Diabetis insipidus			1,243	1,074	70	4,30	0,30	553	77 %	719	0,169	1,215	0,914	1,39
5	H.L. m	Normalfall	120/80	1,1	1,545	1,455	170	1,33	0,223	571	86,5%	660	0,390	2,574	2,351	1,39
6	L.H. m	Interstit. Nephritis	130/90	0,9	1,485	0,095	135						0,390			3,67
7	B.W. m	Normalfall	100/70	1,0	1,817	1,627	68	1,44	0,098	380	87 %	436	0,190	0,828	0,730	1,06
8	S.E. w	chron.Glomerulonephritis	120/70	1,0	1,561	1,222							0,339			0,18
9	R.K. m	Normalfall	110/75	1,1	1,746	1,210	184				88 %		0,536			3,18
10	H.J. m	ren.Hypertonie	150/100	1,3	1,562	1,024	162,5				88,5%		0,538			1,17

[illegible]

Lfd. Nr.	Name Geschl. Alter	Diagnose	RR	Krea- tinin mg%	Art. Wert mg&	Ven. Wert mg%	Urin y/ml	Harn Min.- volum. ml/Min	mgCl Urin/ Min	C _{PAH} ml/ Min	E _{PAH}	Plasma Minut. volum. ml/Min	avD/ 100ml Plasma mg%	avD/ Min. mg	aufgen. O ₂ avD Vol. %
21	B.W. m 23 J	chron. Glo- merulone- phritis	100/70	1,1	1,56	1,11	833	1,75	1,458	585	68,6%	852	0,450	3,834	2,376 1,83
22	F.H. w 22 J	nephrot. Syndrom	120/80	0,8	1,67	1,20	42,5	3,76	0,161	715	86,6%	825	0,470	3,878	3,717 1,59
23	B.O. m 32 J	Interstit. Nephritis	110/50	1,4	1,20	0,80	186,2	1,33	0,247	377	84 %	448	0,40	1,792	1,545 1,17
24	W.F. m 51 J	Interstit. Nephritis	130/80	2,7	2,442	1,635	30	2,58	0,0774	68	38,4%	177	0,807	1,428	1,351 1,39
25	J.O. m 30 J	chron. Pye- lonephritis	150/110	1,3	1,26	0,96	25	2,35	0,0575	220	69,1%	318	0,37	1,177	1,119 2,11
26	B.E. m 50 J	Hypertonie	220/135	1,3	2,03	1,07	237	1,0	0,237	182	87,1%	208	0,96	1,997	1,760 2,60

Bei 23 Fällen wurde die mittlere Konzentration des Zitronensäuregehaltes im arteriellen und venösen Blut bestimmt. Dabei wurden die Fälle 6, 9, 13 nicht berücksichtigt, da die O_2 avD von über 3 Vol% es zweifelhaft erscheinen läßt, daß wir mit dem Katheter in der Nierenvene lagen. Für den arteriellen Ci-Gehalt ermittelten wir eine mittlere Konzentration von $1,696 \pm 0,096$ mg% (2,990 bis 1,065mg%), die mittlere Konzentration des aus der Nierenvene gewonnenen Blutes lag bei $1,255 \pm 0,0714$ mg% (1,935 bis 0,800 mg%). (Dabei gibt der hinter $\pm$ stehende Wert hier und auch bei den folgenden Bestimmungen jeweils den mittleren Fehler des Mittelwertes an.)

An Abb.4 wird die Abhängigkeit des venösen Gehaltes der Zitronensäure von der des arteriellen graphisch dargestellt.

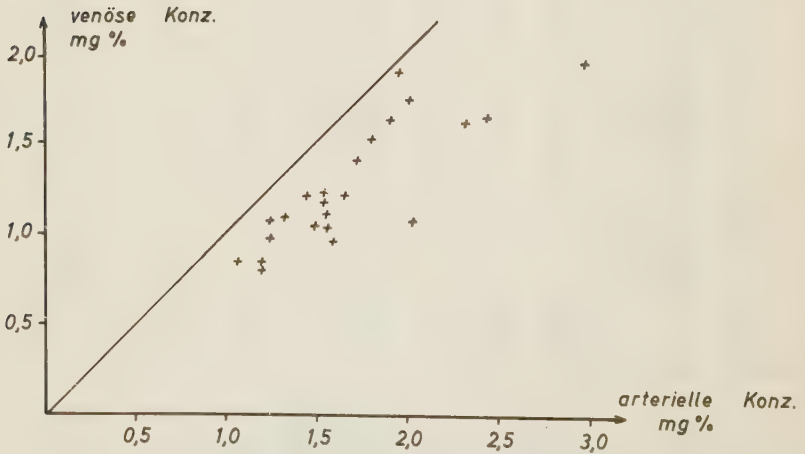


Abb. 4: Abhängigkeit des venösen Gehaltes der Zitronensäure von dem des arteriellen

Aus Abb.4 läßt sich deutlich ersehen, daß bei jeder Einzelbestimmung der arterielle Wert über dem des venösen liegt, d.h. wir fanden niemals eine negative arterio-venöse Differenz.

Wir bestimmten nun bei denselben 23 Fällen die arterio-venöse Differenz für Zitronensäure und errechneten dafür einen Mittelwert von $0,442 \pm 0,0156$ mg% (0,995 bis 0,082 mg%). Mit anderen Worten extrahiert die Niere aus jeweils 100 ml des durchströmenden Plasmas 0,442 mg Zitronensäure. Im t-Test nach Student ermittelten wir für die avD ein t von 2,762, was einem p von weniger als 0,02 entspricht. Damit ist bewiesen, daß die Extraktion von Zitronensäure durch die menschliche Niere in einem statistisch gesicherten Ausmaß stattfindet.

Da bei den Einzelbestimmungen sowohl der arterielle Blutspiegel, als auch die avD erhebliche Schwankungen im Zitronensäuregehalt aufwies, versuchten wir zu klären, ob eine Abhängigkeit zwischen der Höhe des arteriellen Ci-Spiegels und der Höhe der avD besteht; d.h., ob sich eine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Ci-Extraktion und dem arteriellen Angebot nachweisen läßt. Zu diesem Zweck bestimmten wir den Regressionskoeffizienten r, der bei unseren 23 Fällen 0,666 betrug. Dies entspricht einem p von kleiner als 0,001. Es besteht also eine absolut signifikante Abhängigkeit zwischen der Extraktion der Zitronensäure durch die menschliche Niere von der Höhe des arteriellen Ci-Gehaltes. Dieses Verhältnis veranschaulicht Abb.5.

Wir haben bis jetzt zeigen können, daß eine statistisch gesicherte Extraktion von Zitronensäure durch die Niere stattfindet und daß diese abhängig vom arteriellen Angebot ist.

Um das Ausmaß der Zitronensäureextraktion zu erkennen, ist die Kenntnis der Plasmadurchströmung der Niere pro Minute notwendig. Bei insgesamt 18 unserer 26 Versuchspersonen (nicht erfaßt wurden die Fälle 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15) konnten wir dazu die PAH-Clearance und die PAH-Extraktion bestimmen und damit das arterielle Angebot an die Niere sowie die renale Extraktion pro Minute errechnen.

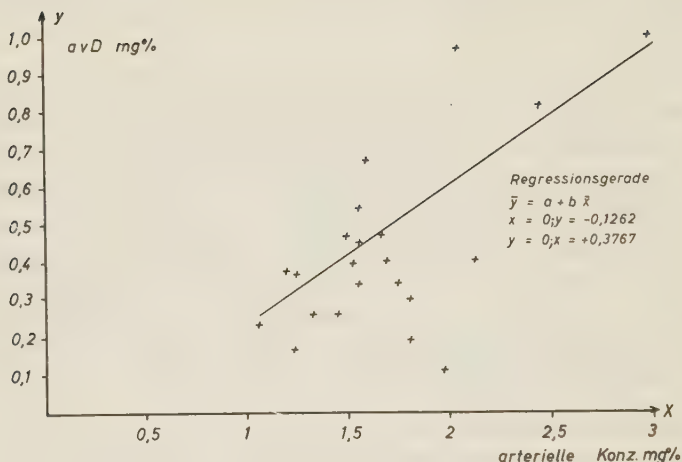


Abb. 5: Abhängigkeit der avD in mg% von der arteriellen Ci-Konzentration in mg%.

Für das arterielle Angebot fanden wir einen Mittelwert an Ci von $9,984 \pm 1,184$ mg/Min (19,943 bis 4,007 mg/Min). Der Mittelwert der avD/Min betrug $2,576 \pm 0,341$ mg/Min (6,380 bis 0,186 mg/Min), d.h. die Niere extrahiert in einer Minute durchschnittlich 2,576 mg Zitronensäure aus dem arteriellen Blut.

Es war nun zu vermuten, daß auch hier zwischen dem Zitronensäureangebot pro Minute und der renalen Extraktion eine gesicherte Abhängigkeit besteht. Wir erhielten einen Regressionskoeffizienten $r = 0,8237$, welcher wiederum einem p von kleiner als 0,001 entspricht. Damit besteht auch hier eine statistisch gesicherte Parallelität der Zitronensäureaufnahme durch die Niere von der Höhe des arteriellen Angebotes pro Minute. Diese Beziehung wird in Abb.6 deutlich.

Unsere bisherigen Ausführungen zeigen deutlich, in welchem Maß Zitronensäure aus dem arteriellen Blut entzogen wird,

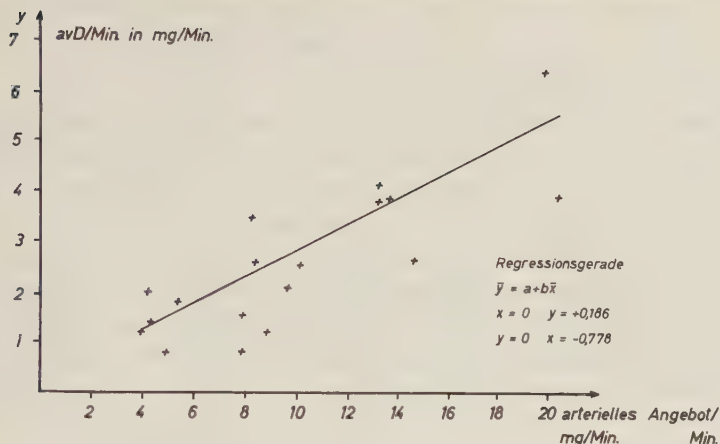


Abb. 6: Abhängigkeit der Zitronensäure avD/Min zum arteriellen Angebot/Min

und die Kriterien, die für die Höhe des Entzuges entscheidend sind. Damit ist aber noch nichts über den Verbleib der Ci gesagt. Einen weiteren Einblick in das Schicksal der extrahierten Zitronensäure gibt die Bestimmung des Ci-Gehaltes im Urin. Es ist also zu untersuchen, ob überhaupt und in welchem Maß Ci ausgeschieden wird.

Bei 24 Versuchspersonen wurde der Urin in der oben beschriebenen Weise auf Zitronensäure untersucht. (Fall 3 und 8 wurden nicht berücksichtigt.) Wir fanden dabei in einem ml einen durchschnittlichen Ci-Gehalt von $166\gamma = 0,0166 \pm 0,0362$ mg/ml (863 bis 25 γ). In Fall 8 der Tab.1 konnten wir während des Versuches kein Urin gewinnen (Anurie), in Fall 3 dagegen fanden wir kein Ci im Harn, ein Ergebnis, auf welches wir unten noch zurückkommen werden.

Um auch hier vergleichende Werte zu erhalten, prüften wir in 18 Fällen (ausgenommen Fall 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15), ob eine Abhängigkeit zwischen der Ci-Ausscheidung pro Minute und dem arteriellen Angebot/Min besteht. Für die Ci-

Ausscheidung/Min fanden wir einen Mittelwert von $293\gamma = 0,293 \pm 0,0824$ mg/Min (1,458 bis 0,058 bzw. 0,000 mg/Min). Der Mittelwert des arteriellen Angebotes von $9,984 \pm 1,184$ wurde oben schon errechnet.

Wir bestimmten auch hier den Regressionskoeffizienten und erhielten ein $r = 0,3332$; dies entspricht einem p von größer als 0,1, d.h., daß zwischen dem arteriellen Angebot und damit, wie wir oben schon zeigten, auch der renalen Ci-Extraktion und der Zitronensäureausscheidung keine statistisch zu sichernde Abhängigkeit besteht. Die Höhe der Zitronensäureausscheidung im Urin muß also von anderen Faktoren abhängig sein. Das Verhältnis von Ci-Ausscheidung und arteriellem Angebot zeigt Abb.7.

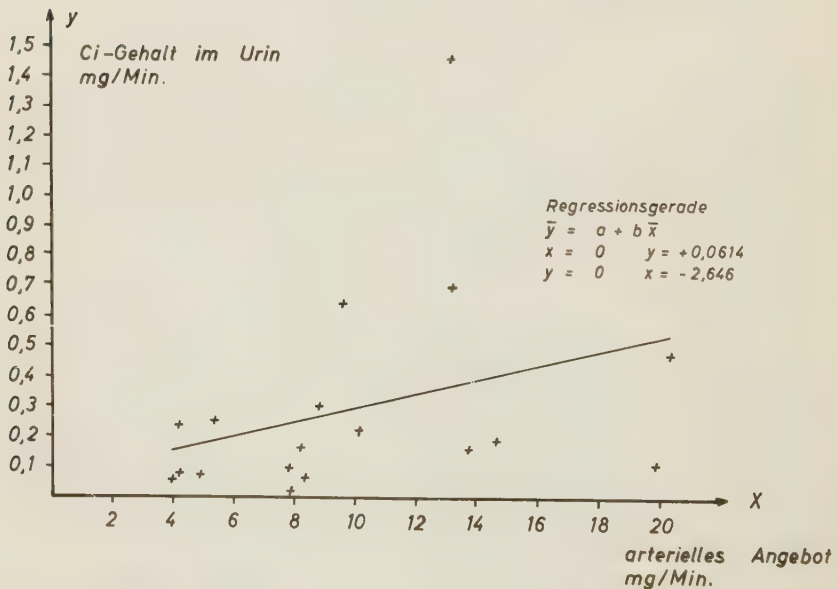


Abb. 6: Abhängigkeit der Ci-Ausscheidung/Min durch die Niere zum arteriellen Angebot/Min

6. Ergebnisse

=====

Zum Abschluß wollen wir noch die drei klinischen Hauptgruppen unseres Krangutes in den wesentlichen Werten kurz einer vergleichenden Betrachtung unterziehen. (vergl. auch Tab.1)

Nr.	Art.Wert	Ven.Wert	Plasma MinVol	avD/Min	mgCi Urin/Min	aufgen. Ci/Min
5	1,545	1,155	660	2,574	0,223	2,351
7	1,871	1,627	436	0,828	0,098	0,730
14	2,330	1,605	572	4,140	0,695	3,446
20	1,065	0,833	909	2,109	0,641	1,468
<u>Mittel- werte</u>	1,704	1,405	644	2,414	0,414	1,999

Tab. II: Nierengesunde

Nr.	Art.Wert	Ven.Wert	Plasma Min.Vol	avD/Min	mgCi Urin/Min	aufgen. Ci/Min
2	2,990	1,935	667	6,380	0,113	6,236
17	1,815	1,515	272	0,816	0,075	0,741
21	1,560	1,110	852	3,834	1,458	2,834
<u>Mittel- werte</u>	2,088	1,520	597	3,677	0,549	3,270

Tab. III: chron. Glomerulonephritis

Nr.	Art.Wert	Ven.Wert	Plasma MinVol	avD/Min	mgCi Urin/Min	aufgen. Ci/Min
1	1,730	1,390	460	1,564	0,000	1,564
19	1,500	1,031	562	2,630	0,065	2,565
23	1,200	0,800	448	1,792	0,247	1,545
24	2,442	1,635	177	1,428	0,077	1,351
25	1,260	0,960	318	1,177	0,058	1,119
<u>Mittel- werte</u>	1,626	1,163	393	1,718	0,089 (0,112)	1,629

Tab. IV: Pyelo- und interstitielle Nephritis

Wie wir aus den Tab. II - IV ersehen, schwanken auch innerhalb der Gruppen des Krankengutes die einzelnen Werte erheblich. Betrachten wir allerdings die Mittelwerte, können wir doch einige Aussagen machen. So sind die arteriellen Ci-Konzentrationen in der Gruppe der chron. Glomerulonephritiden am höchsten, während sie bei den Nierengesunden und den Pyelo- und interstitiellen Nephritiden etwa gleich sind. Das durchschnittliche Plasmaminutenvolumen nimmt von II bis IV ab, wobei der Sprung zur 3. Gruppe ganz erheblich ist. Entsprechend ist auch die avD/Min in der letzten Krankheitsgruppe am geringsten, in der Gruppe der chron. Glomerulonephritiden dagegen auch im Vergleich mit den Nierengesunden erstaunlich hoch. Am auffälligsten ist aber die Diskrepanz in der Ci-Ausscheidung durch den Urin. Hier finden wir in der 3. Gruppe mit einem Mittelwert von 0,089 mg/Min bzw. 0,112 mg/Min, wenn wir Fall 3, wo sich keine Zitronensäure im Urin nachweisen ließ, nicht berücksichtigen, einen Wert, der gegenüber den Nierengesunden und chron. Glomerulonephritiden nur etwa $1/5$ bzw. $1/4$ der Ci-Ausscheidung beträgt. Auf diese Beobachtung wollen wir in der Diskussion noch näher eingehen.

Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß aus der geringen Zahl der Vergleichsfälle keine absoluten Rückschlüsse gezogen werden dürfen.

7. Diskussion der Ergebnisse

=====

Bei 23 Versuchspersonen wurde für das arterielle Blut ein Ci-Gehalt von $1,696 \pm 0,096$ mg% und für das der Nierenvene entnommene Blut ein Mittelwert von $1,255 \pm 0,0714$ mg% errechnet. Mit diesen Ergebnissen liegen wir durchaus im Bereich der Literatur (3,17). Derartige Vergleiche dürften sich allerdings nur auf die arteriellen Werte beziehen, da z.B. aus der vena cubitalis entnommenes Blut nicht als Maßstab für den Zitronensäuregehalt des gesamten Blutes im Kreislauf

gelten kann. Wie wir schon erwähnten, wird die Hauptmenge der Ci endogen gebildet, woran die einzelnen Organe des Körpers einen verschieden großen Anteil haben. Somit müssen auch die venösen Abflußgebiete einen unterschiedlichen Ci-Gehalt aufweisen. In unseren Versuchen lag die arterielle Ci-Konzentration stets über der des Nierenvenenblutes. Dies ist durchaus nicht selbstverständlich. So haben wir z.B. in zwei Versuchen mittels Herzkatheter vom Einflußgebiet des sinus coronarius das venöse Blut des Herzmuskels entnommen und auf seinen Ci-Gehalt untersucht. Dabei lagen die venösen Werte mit 1,770 mg% und 1,49 mg% deutlich über den arteriellen von 1,70 mg% und 1,33 mg%, d.h., daß im Herzmuskel überschüssige Ci gebildet und abgegeben wurde. Wieweit dieses Ergebnis auf die Niere zu übertragen ist, entzieht sich unserer Kenntnis. Doch ist bei der hohen Oxydationsrate der Niere für Zitronensäure (7) anzunehmen, daß auch hier eine gewisse Synthese von Ci stattfindet, die sich aber durch einen größeren Abbau nicht im Nierenvenenblut bzw. im Urin niederschlägt. Daß neben der Aufnahme auch eine Synthese von Zitronensäure in der Niere vor sich geht, glauben Brodwell und Laake (1) auf Grund ähnlicher Versuche mit Sicherheit annehmen zu können.

Wie wir in unserer Arbeit weiter zeigen konnten, wird Ci in einem statistisch gesicherten Ausmaß von der menschlichen Niere in einer signifikanten Abhängigkeit vom arteriellen Angebot extrahiert. Die in der gleichen Zeiteinheit stattfindende Ausscheidung fällt gegenüber der Extraktion kaum ins Gewicht. Bei einer durchschnittlichen Aufnahme von $2,576 \pm 0,341$ mg/Min bei 18 Fällen hat die Ausscheidung von $0,293 \pm 0,0824$ mg/Min keine Bedeutung. Wie und wo nun die überschüssige Zitronensäure weiter verarbeitet wird, entzieht sich unseren Kenntnissen. Wie schon oben erwähnt, konnte mit radioaktiver Ci nachgewiesen werden, daß der Abbau der Zitronensäure außerordentlich schnell vor sich geht. Gesichert ist auch die Stellung der Ci im Krebszyklus. Ob aber die gesamte aufgenommene Ci Eingang in den Cyklus findet, dort abgebaut und damit zu einem wesentlichen Energielieferanten wird, können wir nicht sagen, zumal im Krebszyklus

ja immer wieder von selbst Ci gebildet wird (s. Abb. I), er also auf eine Zufuhr von außen nicht angewiesen ist. Da aber über den Zitronensäurecyklus nicht nur die Hauptnahrungsstoffe abgebaut werden, wobei eine Synthese von Ci aus Oxaloesigsäure und Acetyl-CoA erfolgt, sondern ebensoviele körpereigene Stoffe im Krebscyklus gebildet werden, dürfen wir wohl annehmen, daß die Hauptmenge der von der Niere aufgenommenen Ci auch ihren Abbau im Krebscyklus findet.

Werfen wir nun noch einen Blick auf die im Urin ausgeschiedene Zitronensäure. Verglichen mit dem arteriellen Angebot von 9,984 mg/Min bzw. der renalen Extraktion von 2,576 mg/Min erscheint die Ausscheidung von $0,293 \pm 0,0824$ mg/Min gering. Auf der anderen Seite gehört die Ci mit einer Tagesausscheidung von ungefähr 0,5g, nach anderen Autoren (18, 10, 16) 0,8 bis 1g, zu den mit am reichlichsten vorkommenden Substanzen im Harn. Betrachten wir nun die einzelnen Werte für die Ci-Ausscheidung/Min, so finden wir hier die größten Schwankungen aller unserer Messungen (von 0,058 bis 1,458 mg/Min, Fall 3 mit 0,00mg nicht eingeschlossen).

Wie Otto (16, 17) in mehreren Arbeiten zeigen konnte, scheiden gesunde Menschen täglich 600 - 800 mg Ci aus. Unsere Durchschnittswerte für Nierengesunde lagen etwa bei 600mg/die. Bei Niereninsuffizienz, besonders in urämischen Endstadien, fand er nur noch 1/10 und noch weniger der täglich ausgeschiedenen Ci-Menge im Harn. Darin sieht Otto, was er an mehreren Beispielen erhärtet, einen engen Zusammenhang zwischen Nierenfunktion und Citratausscheidung. Zu ähnlichen Resultaten kommen auch Hubmann und Taubnitz (10), welche bei durch Clearance-Untersuchungen ermittelten Einschränkungen der Nierenfunktion auch eine verminderte Clearance für Citrat feststellten. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen vollauf überein. In Übereinstimmung mit diesen Autoren stellten wir ebenfalls fest, daß der Citratgehalt im Serum dabei diesen Schwankungen nicht unterliegt, sondern dort durchaus normale Verhältnisse gefunden werden (18, 10, 16, 17). Daß man aber, wie wir in unserem Fall 3, überhaupt kein Ci im Urin findet, können wir damit nicht ganz erklären. Ebenso ist noch

unbekannt, welcher Teilfunktion der Niere die beschriebenen Citratbefunde zuzuordnen sind.

Die eigentliche Frage, die wir zu Beginn dieser Arbeit stellten, ob Ci durch die menschliche Niere extrahiert wird, können wir eindeutig bejahen. Die Bedeutung der Ci im Stoffwechsel wurde schon besprochen. In welchem Maße nun die Ci den Energiebedarf der Niere deckt, können wir nicht sicher sagen. Da die Niere aber durchschnittlich 12 - 15g Ci/die aufnimmt, daneben höchstwahrscheinlich auch noch zur Synthese fähig ist, aus einem Molekül Ci im Krebszyklus aber 12 ATP gewonnen werden, dürfen wir annehmen, daß ein ganz erheblicher Teil der von der Niere benötigten Energie durch die Zitronensäure gedeckt wird.

8. Zusammenfassung =====

Nachdem wir kurz die Fragestellung dieser Arbeit, ob die menschliche Niere Zitronensäure extrahiert, erläuterten, wird auf die Stellung der Ci im Zitronensäurezyklus (Krebs) und im Organismus eingegangen. Versuchsvorbereitung und Versuchsbedingungen werden eingehend beschrieben.

Zur Bestimmung der Zitronensäure im Plasma und Urin benutzen wir eine Methode, bei der Zitronensäure in Pentabromazeton überführt und später colorimetrisch bestimmt wird. Dies geschieht in zwei Schritten:

- 1a.) Zitronensäure wird im sauren Milieu durch Zugabe eines Oxydationsmittels zu Azetondicarbonsäure oxydiert.
 - b.) Azetondicarbonsäure oxydativ zu Azeton decarboxyliert.
 - c.) In Gegenwart von Brom wird Azeton zu Pentabromazeton bromiert.
- 2.) Das im Extraktionsmittel (Hexan) gelöste Pba gibt mit einer Thioharnstoff-Borax-Lösung in alkalischem oder neutralem Milieu eine gelbe Farbe, die mit dem Eppendorf-Photometer gegen einen Leerwert bestimmt wird.

Die von Gey (5) beschriebene Methode wurde geringfügig verändert. Besonders vorteilhaft erwies sich dabei der Zusatz 20%iger Metaphosphorsäure. Die einzelnen Modifikationen sind ausführlich besprochen. Durch die Verbesserungen konnte eine Differenz der Doppelbestimmungen von unter $\pm 4\%$ erreicht werden, worin die Fehlerbreite des Photometers von $\pm 2\%$ ebenfalls erfaßt ist.

Ein Teil des Stoffwechsels der Niere wird durch Messung der arterio-venösen Differenz für Zitronensäure untersucht. Dabei kamen wir zu folgenden, statistisch gesicherten Ergebnissen:

1. Der arterielle Zitronensäurespiegel lag im Mittel bei $1,696 \pm 0,096$ mg%.
2. Der venöse Zitronensäurespiegel lag im Mittel bei $1,255 \pm 0,0714$ mg%.
3. Die arterio-venöse Differenz betrug $0,442 \pm 0,0156$ mg%, Zitronensäure wird also durch die menschliche Niere extrahiert.
4. Die Extraktion ist abhängig von der arteriellen Konzentration.
5. Die Extraktion ist abhängig vom arteriellen Angebot/Min, errechnet aus PAH-Clearence und PAH-Extraktion.
6. Ein unterschiedliches Verhalten des Zitronensäurespiegels in den einzelnen Krankheitsgruppen läßt sich nicht erkennen.
7. Zitronensäure wird in relativ geringem Maße durch die Nieren ausgeschieden. Im Mittel $0,166 \pm 0,0362$ mg/ml.
8. Das Ausmaß der Urinausscheidung ist unabhängig vom arteriellen Angebot.
9. Mit eingeschränkter Nierenfunktion vermindert sich die Ci-Ausscheidung.

Über die Möglichkeit, einen Teil des Energiebedarfes der Niere über die Zitronensäure zu decken, wird diskutiert.

9. Literatur

=====

1. BRODWELL, E.K.; LAAKE, H.: The renal metabolism of Citric Acid.
Acta Medica Scandinavia 1963, Vol.174, fasc.4
2. COHN, C.; KATZ, B.; KOLINSKY, M.: Renal gluconeogenesis in intact dog.
Am.J.Physiol. 1951, 165, 423
3. DE LUCA, H.F.; GRAN, F.; REISER, S.; und STEENBOCK, H.:
Juorn.biol.Chem 1959, 234, 1912
4. FISHLER, M.C.; ENTEMANN, C.; MONTGOMERY, L.; CARKOFF, J.L.:
The formation of phospholipid by the hepateotomized dog as measured of radio-active phosphorus.
J.biol.Chem. 1943, 150, 47
5. GEY, F.K.: Zur quantitativen Bestimmung der Zitronensäure im Blut und Urin mittels Pentabromazetonbildung.
Intern.Zeitschr.Vitaminforschung 1953, 25, 21
6. GORDON, E.: The metabolism of Citrate-C¹⁴ in normal and in fluorinhibitor poisoned rats.
Journ.Clin.Invest. 1961, 40, 1719
7. GRAFFLIN, A.L.; GREEN, D.E.: Studies on the cyclophorase system. II. The complete oxydation of fatty acids.
J.biol.Chem. 1948, 176, 95
8. HARGREAVES, CH.A.; ABRAHAMS, M.D. and VICKERY, H.B.: Determination of Citric and d-Isocitric Acids.
Analytical chemestrie 1951, 23, 467
9. HOHENLEITNER, F.J. und SPITZER, J.J.:
Am.J.Physiol. 1961, 200, 1095
10. HUBMANN, R. und TAUBNITZ, E.: Wie verhält sich Citronensäure in Clearanceuntersuchungen im Vergleich mit anderen Clearancesubstanzen?
Arztliche Forschung 1952, 16, 356-360
11. KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie 1962, S.176
12. KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie 1962, S.179
13. KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie 1962, S.335
14. Mc CANN, W.R. and JUCKE, J.R.: The Synthesis of glucose by the kidneys.
Bull. John Hopkins Hospital 1958, 103, 77

15. NIETH, H. und Mitarbeiter: Extraktion der freien Fettsäuren durch die menschliche Niere.
16. OTTO, H.: Die Bedeutung der Zitronensäureausscheidung im Harn für die Diagnostik der Nierenfunktion.
Schweizer Med.Wochenschr. 1957, 87, 27
17. OTTO, H.: Über den Einfluß des Carboanhydrasehemmstoffes 2-Acetylamino-1,3,4-Thio-diazol-5-Sulfoamid (Acetolamid) auf die Zitronensäureausscheidung im Harn.
Klinische Wochenschr. 1958, 36, 633-636
18. RECHENBERGER, J. und BENS DORF, S.: Über den Zitronensäurespiegel des Blutes.
Zeitschr.f.klin.Med. 1957, 154, 648-659
19. RICHTERICH, H.: Enzymatische Vorgänge bei der Harnbereitung. Biochemie und Diurese.
Springer 1959
20. SALANT and WISE: J.biol.Chem. 1916, 28, 27
21. SRERE, P.A.; CHAIKOFF, J.L.; TREITMAN, S.S.; BURSTEIN, L.: J.biol.Chem. 1950, 182, 629
22. WEBER, G.: Kidney enzymes of gluconeogenesis, glycolysis and direct oxydation.
Proc.Soc.exp.Biol. 1961, 108, 631
23. WIIG, E.O.: Journ.physikal.Chem. 1928, 32, 961
PEDERSEN, K.J.: Am.Chem.Soc. 1929, 51, 2098

Lebenslauf

Ich, Karl Theo Eysel, wurde am 27. Oktober 1938 als Sohn des Dr. jur. Karl Theodor Eysel und seiner Ehefrau Maria, geb. Okolowitz, in Eschwege geboren.

Die Volksschule und das Realgymnasium besuchte ich in Kassel, wo ich auch 1959 das Abitur bestand. Anschließend leistete ich meinen einjährigen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Mai 1960 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Marburg. Dort bestand ich nach dem 2. Semester die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung. Auch das 1. klinische Semester hörte ich noch in Marburg. Dann studierte ich ein Semester an der Universität Wien. Anschließend machte ich eine dreimonatige Wehrübung.

Danach setzte ich mein Medizinstudium in Tübingen fort. Famuliert habe ich in Tübingen, Erlangen und Villingen. Nach dem 11. Semester meldete ich mich in Tübingen zum Staatsexamen, das ich am 26. 1. 1966 bestand.

